

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-344899

(43)公開日 平成5年(1993)12月27日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/02	Z N A C	8214-4B		
// C 1 2 N 15/51				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:91)				
	8931-4B		C 1 2 N 15/ 00	A
			審査請求 未請求	請求項の数 1 (全 13 頁)

(21)出願番号 特願平4-152487

(22)出願日 平成4年(1992)6月11日

(71)出願人 591222245

国立予防衛生研究所長

東京都品川区上大崎2丁目10番地35号

(72)発明者 宮村 達男

東京都杉並区浜田山4-21-22-113

(72)発明者 斎藤 泉

東京都渋谷区代々木2-37-15-412

(72)発明者 松浦 善治

埼玉県上福岡市福岡1丁目3番5-406号

(72)発明者 本多 喜貞

神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地三菱

化成株式会社総合研究所内

(74)代理人 弁理士 中村 稔 (外6名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C型肝炎ウイルス外被タンパク質の産生法

(57)【要約】

【構成】 C型肝炎ウイルス外被タンパク質をコードするDNA断片を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を培養し、細胞外にC型肝炎ウイルス外被タンパク質を産生させる方法。

【効果】 C型肝炎ワクチン、診断用抗原として利用できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 C型肝炎ウイルスの外被タンパク質をコードするDNA断片を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を培養し、細胞外に産生するC型肝炎ウイルス外皮タンパク質を取得することを特徴とするC型肝炎ウイルス外皮タンパク質の産生方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、C型肝炎ウイルスゲノムから翻訳される外被タンパク質の産生法に関し、さらに詳しくは、C型肝炎ウイルス（以下HCVという）遺伝子にコードされるタンパク質であって、ワクチン及び抗HCVエンベロープタンパク質抗体を検出するための診断薬としての利用が期待される第一番目のエンベロープタンパク質（以下E1と略す）と呼ばれる糖タンパク質の産生法に関する。

【0002】

【従来の技術】1988年米国カイロン社によって、従来非A非B型肝炎ウイルスと呼ばれて来た新種のヒト肝炎ウイルス一つがクローニングされ、HCVと命名され、その遺伝子断片がコードするペプチドとヒト・スーパーオキシド・ジスムターゼ（SOD）を組換え酵母で産生させた融合蛋白（C100-3）がC型肝炎診断薬として開発され、輸血後肝炎の71%、散発性肝炎の58%が該抗体陽性であることが明かとなった【サイエンス（Science）, 244, 359-362, 362-364, (1989)】。

【0003】すなわち、従来主としてウイルスで汚染された輸血または血液製剤により感染すると考えられていたC型肝炎が散発的にも発生することが明らかとなったのである。このことは、C型肝炎の予防にワクチンによる免疫が有効である事を強く示唆している。

【0004】その後、日本人の患者血清由来のHCV遺伝子がクローニングされ、日本で流行しているHCVは、カイロン社が得たものと似ているが明かに異なる配列からなる日本株であることが判明した【蛋白質 核酸 酵素, 36, 1679-1691, (1991)】

が、米国株との抗原性の相違は明確となっておらず、これまでの所アミノ酸配列の多様性にもかかわらず、C型肝炎ウイルスの血清型は一つであると考えられている。

【0005】上記C100-3抗体測定系は、検出率及び検出感度が低く、現在第二世代の診断薬としてコア、NS3、NS5領域等のタンパクの混合物がより有効な検出用抗原として使用されているが、未だ個々のウイルスタンパクに対する抗体測定系は確立されておらず、新たな診断薬、診断法が期待されている。また、C型肝炎を予防するワクチンや治療する薬もまったく開発されていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的

は、C型肝炎の発症を予防するワクチン及び新たな診断薬を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明の目的は、C型肝炎ウイルスの外被タンパク質をコードするDNA断片を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を培養し、細胞外に産生するC型肝炎ウイルス外皮タンパク質を取得することにより達成できる。類似の遺伝子構成を持つベステウイルスあるいはフラビウイルスの例から推定して、C型肝炎ウイルスの外被タンパクが感染防御抗体を誘導すると考えられ、また該タンパク質に対する抗体を検出することによりC型肝炎患者の病状を判定する新規なC型肝炎診断薬とすることができると推定される。従って、本発明の目的は上記方法、特に、E1領域由来のタンパク質を、好ましくは昆虫細胞又は動物細胞産生タンパク質として高率に発現させることにより達成できる。

【0008】ところで、E1領域由来のタンパク質は細胞膜結合型糖タンパク質であり、一般に組換え体では発現量が少ない、細胞からの精製が困難、等の理由でこの領域の抗原蛋白質をワクチンあるいは診断薬として使用することは困難と考えられていた。本発明者の一部も既に該タンパク遺伝子cDNAを昆虫細胞及び動物細胞で発現させたが、産生量が少なく精製は困難であった【ジャーナル オブ ビロロジー(J. Virol.), 66, 1425-1431, (1992)】。さらに一般に知られている、膜タンパク質C末端アンカー領域を切断し、目的のタンパク質を細胞外に分泌発現させることにより発現精製効率を高める方法【サイエンス（Science）, 238, 1704-1707, (19-87)】も試みたが効果はなかった。しかしながら、本発明者らは、E1領域のC末端アンカー領域と中央部の疎水性領域を欠失させたcDNAを昆虫細胞あるいは動物細胞で発現させると、E1タンパク質が、予想外にも高率に細胞外に分泌発現することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】本発明のE1タンパク質は、HCV遺伝子にコードされるタンパク質であり、第一番目の外被タンパク質とよばれる領域のタンパク質であって、例えば、配列表の配列番号1および2に示すようなものである。このようなタンパク質において、一部のアミノ酸を除く、挿入、修飾あるいは追加する等の改変を行って得られるタンパク質も、それがヒトに対する免疫原性やC型肝炎患者血清との反応性を損なわない限り、本発明に含まれるものであることは、いうまでもない。

【0010】【1】配列表の配列番号1に示すC型肝炎患者血清由来cDNAクローンを得る方法と該クローンの塩基配列を決定する方法

配列表の配列番号1に示す塩基配列で表される、E1タンパク質をコードする遺伝子またはDNA断片は、例えば、次のような方法によって得られる。

【0011】このHCVは、血清中に微量しか存在しない上、遺伝子がRNAであり、従来のcDNAクローニング法であるOkayama-Berg法や、Gubler-Hoffman法を基本とした方法でのクローニングには困難が予想されたので、少量の血清から変異の多い該遺伝子を確実にクローニングするために、以下の方法によった。

【0012】即ち、後述の実施例1で示すようにC型肝炎患者の血清から核酸を抽出する。該血清としては、通常、オルソ社の検査キットでの測定値でODが3.5以上のものを使用するのが好ましいが、この値のものに限られるわけではない。血清にはウイルスRNAのキャリアとしてトランスファーRNA (tRNA) を混ぜておくのが好ましい。キャリアは必ずしもtRNAに限られるものではなく、ポリリボヌクレオシドであれば代用できる。ただし、tRNAを使用すればインタクトな長さをもったtRNAが必要量存在するかどうかを電気泳動で迅速に確認できる利点がある。またこの確認をすることで、少なくとも、ウイルスRNAのキャリアとしてtRNAを混合した段階以降において、ウイルスRNAの分解があるかどうかを確認することができる。かかる核酸からcDNAをクローニングする手段としては、Saikiらの開発したポリメラーゼ チェイン リアクション法〔(PCR法) ネーチャー (Nature)、324、126、(1986)〕を利用することが好ましい。まず、

配列番号4 S1: 5' CGCTGCAGAC CGTGCATCAT GAGCAC 3'

これらの配列で5'側の配列の数塩基を他の配列に変えても良いが、好ましくは5'側から10塩基以内の範囲で数塩基内であれば良い、さらに好ましくは、5'側から5塩基以内の範囲が良い。また、これらの配列で5'側の配列の4から5塩基を欠如してもよいが、5'側から数塩基の欠如が好ましい。また、8から12塩基程度であれば5'側に任意の配列を付加してもよいが、好ましくは5から6塩基の付加、さらに好ましくは数塩基の付加が良い。

【0016】このようにして得られたDNA断片は、常法によりクローニングベクター (例えば、pUC19) のクローニングサイトの1つ (例えば、SmaIサイト) に組み込まれる。このDNA断片を持つプラスミドを用いて、クローンの塩基配列を両鎖に関して決定する。塩基配列の決定は、ジデオキシ法により、例えばフォーデアザシークエンス キット (宝酒造社製) やデュボン社製蛍光シークエンス ジェネシス2000 (GENESIS 2000) システムを用いて、該キットのプロトコールに従って容易に行うことができる。塩基配列が決定しにくい部位や、決定しようとするDNA断片が約180塩基対以上ある場合には、常法に従い、サブクローニングを行えばよい。このようにして決定された、DNA断片の塩基配列から推定されるタンパク質のアミノ酸配列は、配列表の配列番号1に表される通りである。

【0017】〔2〕〔1〕で得られたクローンにコー

ウイルスRNAを鋳型にして逆転写酵素を反応させる。この時、使用するプライマーとしては、市販のランダムプライマーでも良いし、下記配列番号3に示したプライマーAS1の様な塩基配列の合成DNAを用いても良い。

【0013】

配列番号3 AS1: 5' CGGGATCCGG AGTAACTGCG 3'
これらの配列で5'側の配列の数塩基を他の配列に変えても良いが、好ましくは5'側から10塩基以内の範囲で数塩基内であれば良い、さらに好ましくは、5'側から5塩基以内の範囲が良い。また、これらの配列で5'側の配列の4から5塩基を欠如してもよいが、5'側から数塩基の欠如が好ましい。また、8から12塩基程度であれば5'側に任意の配列を付加してもよいが、好ましくは5から6塩基の付加、さらに好ましくは数塩基の付加が良い。

【0014】PCR法は、具体的には、実施例1に記述したような条件で実施される。このようにして得られた第1鎖相補鎖DNA (1st cDNA) を鋳型にして実施例1の様にPCR法を行い目的のDNA断片を得ることができる。このとき、PCRの条件は、適宜状況に応じて選択される。センスプライマーとしては、具体的には、例えば、次のようなものが挙げられる。

【0015】

ドされるポリペプチドの発現

大腸菌や真核生物用の発現ベクターに目的クローンを導入する際、ベクター由来の開始コドンのフレームに合うようにすればよく、また、ベクター由来の開始コドンを利用しない場合でも、該クローンの翻訳フレームに合うように5'側に開始コドンが付加してから発現ベクターに導入すればよい。この場合の、該クローンの翻訳フレームとは、例えば代表されるクローンとして示した配列表の配列番号1において、アミノ酸一つに対して対応している3つずつに分けられた塩基配列の枠組みのことである。

【0018】本発明で用いる発現ベクターは、上記のようにして得られたHCV由来のE1タンパク質をコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有している。例えば、大腸菌、枯草菌等、微生物を宿主とするときは、発現ベクターは、プロモーター、リボソーム結合 (SD) 配列、HCV由来の組換えC型肝炎E1タンパク質遺伝子、転写終結因子、及びプロモーターを制御する遺伝子より成ることが望ましい。

【0019】プロモーターとしては、大腸菌、ファージ等由来のもの、例えば、トリプトファン合成酵素 (trp)、ラクトースオペロン (lac)、ラムダファージPL、PR、T5 初期遺伝子P25、P26プロモーター等が挙げられる。また、これらは独自に設計された配列でも良い。

【0020】リボソーム結合配列としては、大腸菌、ファージ等由来のものでも良いが、独自に設計された配列を合成により作成した16SリボソームRNAの3'末端領域に相補的な配列を4塩基以上連続して持つコンセンサス配列を持ったものでも良い。転写終結因子は必ずしも必要ではないが、 ρ 非依存性のもの、例えばリボプロテインターミネーター、trpオペロンターミネーター、等を有している方が望ましい。

【0021】さらに、これらの発現に必要な因子の発現プラスミド上での配列順序は、5'上流から、プロモーター、SD配列、HCV由来のE1タンパク質遺伝子、転写終結因子の順に並ぶことが望ましい。

【0022】発現ベクターとしては、市販のpKK233-2（ファルマシア社製）等が使用できる。また、融合タンパクとして発現させるには、発現ベクターpGEXシリーズ（ファルマシア社製）等が使用される。

【0023】宿主の形質転換法としては、以下の実施例に示すように東洋紡績社のプロトコールに従うか、常法に従って行うことができる。

【0024】形質転換体の培養は、モレキュラー クローニング(Molecular Cloning, 1982)に記述の方法を参考に行えばよい。培養温度は28℃から42℃程度である。

【0025】またE1タンパク質の生産のためには、タンパク質を安定に発現する宿主-ベクター系を選択すること、さらに発現したE1タンパク質が生物学的活性すなわちHCVと同様の抗原性を有している必要がある。特に天然のE1タンパク質が糖タンパク質と予測されること、またE1タンパク質が多くのシステイン残基を含み、そのシステイン残基間のチオール結合の位置およびタンパク質の高次構造が活性維持に重要であることを考慮した場合、宿主としては、昆虫細胞、例えばSf9細胞、Sf21細胞等、好ましくはSf9細胞が、また動物細胞、例えばCHO細胞、COS細胞、マウスL細胞、マウスC127細胞、マウスFM3A細胞等、好ましくはCHO細胞を用いて発現させることが望ましい。またこれらの細胞を宿主とする場合は、配列番号1に示すアミノ酸配列の内、シグナル様配列、すなわち174から191番目を持つE1遺伝子を細胞内に導入することにより、プロセッシングされたE1タンパク質が産生されることが期待される。これらの昆虫細胞または動物細胞を宿主とする発現用プラスミドは次のように構築される。

【0026】昆虫細胞でのプロモーターとしては、多核体プロモーター（実験医学、8、93-96、1990）が、動物細胞でのプロモーターとしては、アデノウイルスE1A遺伝子による活性型プロモーター〔続生化学実験講座1、遺伝子研究法II、189-190、(1986)〕、SV40初期プロモーター、SV40後期プロモーター、アポリポロタンE遺伝子プロモーター、SR α プロモーター

〔モレキュラー アンドセルラー バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 8, 466-472, (1988)〕等が使用されるが、SV40プロモーターまたはSR α プロモーターが好ましい。

【0027】このプロモーターの下流に上記シグナル様配列を含むE1タンパク質遺伝子のDNA断片を転写方向にしたがって挿入する。またE1タンパク質の発現ベクター構築の際には、該プロモーターの下流にE1タンパク質遺伝子断片を2個以上結合したものを挿入してもよい。またE1タンパク質遺伝子のDNA断片の5'上流側にSV40などのプロモーターを結合したDNA断片を単位としたものを、転写方向を揃えて2個以上結合してベクターに挿入してもよい。このE1タンパク質遺伝子の下流には、ポリアデニル化配列が必要である。例えばSV40遺伝子、 β -グロビン遺伝子またはメタロチオネイン遺伝子由来のポリアデニル化配列がE1タンパク質遺伝子の下流に1つ存在することが必要である。またプロモーターとE1タンパク質遺伝子を結合したDNA断片を2個以上結合する場合には、各単位のE1タンパク質遺伝子の3'側にそれぞれポリアデニル化配列を存在させることもできる。

【0028】この発現ベクターを用いて動物細胞、例えばCHO細胞を形質転換する際には選択マーカーを用いることが望ましい。選択マーカーとしては、メトトレキサート耐性を与えるDHFR遺伝子〔ジャーナル オブ モレキュラー バイオロジー (J. Mol. Biol.), 159, 601, (1982)〕、抗生物質G-418耐性を与えるNeo遺伝子〔ジャーナル オブ モレキュラー アプライド ジェネティクス (J. Mol. Appl. Genet.), 1, 327, (1982)〕、ミコフェノール酸耐性を与える大腸菌由来のEcogpt遺伝子〔プロシーディングス オブ ナショナル アカデミーオブ サイエンス ユー・エス・エー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 78, 2072, (1981)〕、抗生物質ハイグロマイシン耐性を与えるhph遺伝子〔モレキュラー アンド セルラー バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 5, 410, (1985)〕等が挙げられ、各耐性遺伝子の5'上流側にはプロモーター、例えば前述のSV40由来のプロモーターや、ヘルペスウイルスのTK遺伝子プロモーターが挿入されており、各耐性遺伝子の3'下流側には、前述のポリアデニル化配列が含まれる。E1タンパク質の発現ベクターにこれらの耐性遺伝子を挿入する場合、E1タンパク質遺伝子のポリアデニル化部位下流に順方向あるいは逆方向に挿入すればよい。これらの発現ベクターは、形質転換体を得る際に、選択マーカー遺伝子を含む別のプラスミドを二重形質転換する必要がない。

【0029】またE1タンパク質の発現ベクターにこれらの選択マーカー遺伝子が挿入されていない場合には、形質転換体の選択マーカーを有するベクター、例えば、pSV2neo〔ジャーナル オブ モレキュラー アプライ

ド ジェネティクス(J. Mol. Appl. Gent.), 1, 327, (1982)]、pMBG (ネーチャー(Nature), 294, 228, (1981)]、pSV2gpt [プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンس ユー・エス・エー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 78, 2072, (1981)]、p AD-D26-1 [ジャーナル オブ モレキュラー バイオロジー(J. Mol. Biol.), 159, 601, (1982)] 等をE1タンパク質遺伝子の発現ベクターと共に二重形質転換し、選択マーカー遺伝子の表現形質により形質転換体を容易に選択できる。

【0030】発現ベクターの昆虫細胞または動物細胞への導入法としては、リン酸カルシウム法〔ビロロジー(Virol.), 52, 456, (1973)]、エレクトロポレーション法〔ジャーナル オブ メンブレン バイオロジー (J. Membr. Biol.), 10, 279, (1972)] 等が挙げられるが、リン酸カルシウム法が一般的である。

【0031】形質転換された細胞の培養は、常法により浮遊培養または附着培養で行うことができる。培地としては、グレース、MEM、Ham F-12等を用い、5~10%血清存在下もしくは適当量のインシュリン、デキサメサゾン、トランスフェリンの存在下、もしくは無血清下にて培養する。E1タンパク質を発現している細胞は、常法に従い患者血清等を用いた蛍光抗体法により検出され、限界希釈法により常法通りクローニングを行う事により、安定にE1タンパク質を産生するセルラインを樹立する事ができる。

【0032】このようにして得られたHCV遺伝子由来E1タンパク質は、アジュバント等と混合しワクチンとしてあるいは診断用HCV抗原として利用でき、HCV抗体を含有する血清と免疫的に反応する該抗原は、例えば、血清等におけるHCV抗体の存在を確認し、あるいは検出をするために有用である。このイムノアッセイの方法には、例えば、RIA (radioimmunoassay)、ELISA (enzyme-linked immunoadsorbent assay)、蛍光抗体法、凝集反応(ラテックス法を含む)、免疫沈殿法等がある。また、検出にはほとんどの場合、標識化抗体が使用され、このために標識化を行う場合、標識化物としては、例えば蛍光物質、化学発光物質、放射性物質、染色物質等が使用される。従って、本発明のHCV遺伝子由来E1タンパク質を抗原として、C型肝炎予防のためのワクチンや治療効果を判定するため等に有用な免疫診断薬を作製することができる。

【0033】

【発明の効果】本発明の方法により産生されるE1領域由来のタンパク質は、C型肝炎予防のためのワクチンとして使用され、該タンパク質を含む診断薬は、血清等におけるHCV抗体の存在を確認し、あるいは検出をするために有用であり、特異的かつ高感度でC型肝炎を診断することができる。

【0034】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1

〔1〕C型肝炎患者血清からの核酸の抽出

C型肝炎患者血清(この血清は、オルソ社製HCV EIAキットでOD=3.5以上の値を示した)10 ml にトリス緩衝液(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, 100 mM NaCl) 25 ml を加え、混和後20,000 g、20℃で20分間遠心し、その上清を更に100,000 g、20℃で5時間遠心した。この沈殿にプロテナーゼK溶液(1%ドデシル硫酸ナトリウム、10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, Protinase K (シグマ社製) 2 mg/ml, yeast tRNA mixture 6.6 μg) 1.5 ml を加え溶解後、90分間45℃で保温し、これに等量のフェノール/クロロホルムを加えた後、激しく混和し遠心分離操作により核酸を含む水相を回収するいわゆるフェノール/クロロホルム処理を4回以上行った。さらに、クロロホルム処理を2回以上行った。この様にして得られた水相に10分の1量の3M酢酸ナトリウムもしくは等量の4M酢酸アンモニウムと水相の2.5倍容のエタノールを加え混和し、-20℃で一晩もしくは-80℃で15分以上静置した後、SW41Tiロータ(ベックマン社製)で35,000 rpmで4時間遠心を行い、核酸を沈殿物として回収した。

【0035】〔2〕cDNAの合成

〔2-1〕RNAサンプルの調製

〔1〕で得られた核酸を乾燥させた後、水30 μl とリボヌクレアーゼインヒビター(100ユニット/μl、宝酒造社製) 10 μl を加え溶解させた。この核酸水溶液を用い下記に示すcDNA合成を行った。

【0036】〔2-2〕アンチセンスプライマーを用いたcDNAの合成

〔2-1〕で調製した核酸水溶液2 μl にアンチセンスプライマー(合成DNAプライマーAS1がアンチセンスプライマーである。15 pmols/μl) 1 μl、10x RT緩衝液(100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl) 2 μl、25 mM MgCl₂ 4 μl、2.5 mM 4dNTP 8 μl、水1 μl を加え65℃5分、次に室温5分保温後、逆転写酵素(ライフサイエンス社製) 25ユニットを1 μl、リボヌクレアーゼインヒビター(100ユニット/μl、宝酒造社製) 1 μl を加え37℃20分、次に42℃30分、最後に95℃2分保温後、すぐに0℃に冷却した(相補鎖DNA合成)。このDNA試料10 μl を用いてSaikiらの方法〔ネーチャー(Nature), 324, 126, (1986)] に準じて、いわゆるPCR法により特異的配列を持つDNAを増幅した。

【0037】即ち、このDNA試料10 μl、10x PCR緩衝液(100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1%ゼラチン10 μl、2.5 mM 4dNTP 8 μl、相補鎖DNA合成時に使用した合成DNAプライマー

(150 pmols/ μ l) 2 μ l、このプライマーに対応した合成DNAプライマー(15 pmols/ μ l、相補鎖DNA合成時に使用した合成DNAプライマーと対になるものであり、前述のプライマーS1を使用した。) 3 μ lに水を加えて合計が100 μ lになるようにして、まず95°Cに5分間保温後、0°Cに急冷した。1分後、Taq DNAポリメラーゼ(7ユニット/ μ l、Ampli Taq™宝酒造社製) 0.5 μ lを加え混和後、ミネラルオイルで重層した。このサンプルを、パーキン エルマー シータス社製のDNA Thermal Cyclerで95°C 1分、40~55°C 1分、72°C 1~5分で25回処理した。最後に72°Cで7分保温した後、この反応水溶液をフェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿(エタノール沈殿とは、水相に1.0分の1量の3M酢酸ナトリウムもしくは等量の4M酢酸アンモニウムと水相の2.5倍容のエタノールを加え混和し、半径5cm程度のロータを用いて15,000 rpm, 4°Cで15分間冷却遠心を行い、その沈殿を乾燥させる処理)を行い、増幅DNA断片を得た。

【0038】〔3〕増幅された該DNA断片のクローニングと塩基配列の決定

〔2-2〕の方法によって得たDNA断片を少なくとも1 pmole 用意し、このDNAを制限酵素Pst I及びBamHI(東洋紡績社製)で消化しフェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿させた後、ライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて、マルチクローニングサイト内にあるPst I及びBamHIで消化したpUC19クローニングベクターに組み込んだ。

【0039】この時ライゲーションに用いたベクターDNAとしては、次の様に用意されたものを5 ng~10 ng 使用した。即ち、pUC19クローニングベクターを制限酵素Pst I及びBamHI(東洋紡績社製)で切断し、フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿させた後、さらにアルカリフォスファターゼ(ペーリンガー・マンハイム社製)で5'末端を脱リン酸化して〔モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning), 1982, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Lab. Press)〕、フェノール/クロロホルム処理し、エタノール沈殿させた。

【0040】この様にして作成したDNAを用いて大腸菌JM109を形質転換させた(この時、コンピテントセルは東洋紡績社製のものを用いた)。形質転換させる方法は、東洋紡績社製のコンピテント ハイ (COMPETENT HIGH)のプロトコールに従った。この様にして、前述のプライマーの組み合わせから〔2-2〕の方法によって得た該DNA断片を持つpUC19クローニングベクターで形質転換させた形質転換体を、少なくとも、20個以上得ることができた。

【0041】このようにして得られた形質転換体の一つpUC010からプラスミドDNAを調製し、デレーションキット(宝酒造社製)のプロトコールに従いデレ

ーション ミュータントを作製し、これらを常法により宝酒造社製7-デアザ シークエンس キットまたはデュボン社製蛍光シークエンサーGENESIS 2000システムを用いて、配列を決定した。シークエンスプライマーとして次の配列番号5及び6に示す2種の合成プライマー

配列番号5 5' d(GTAAAACGACGGCCAGT) 3'

配列番号6 5' d(CAGGAACAGCTATGAC) 3'

を使用し、該DNA断片の+鎖、-鎖の塩基配列を決定した。該DNA断片は配列表の配列番号1に示す通りの塩基配列を有していた。配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列は、それぞれ上記で得られた形質転換体のプラスミドに組み込まれたHCV由来遺伝子の+鎖にコードされている。

【0042】〔4〕E1タンパク質遺伝子の改変

〔3〕で得たプラスミドに含まれるDNA断片からE1タンパク質を高率に分泌発現させるために、以下の改変を行った。まず、〔3〕で得られたプラスミド1 μ gを制限酵素DraIII(ニューイングランド バイオラブ社製)で消化後、制限酵素HgiAIで部分消化し、フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿させた。このようにして得たDNA10 ngに、配列番号7に示す合成リンカー

配列番号7 5' d(AGCGGCCGCT) 3'

5 ngをライゲーションキット(宝酒造社製)を用い挿入した。この様にして作成したDNAを用いて大腸菌DH5を形質転換させた(この時、コンピテントセルは東洋紡績社製のものを用いた)。形質転換させる方法は、東洋紡績社製のコンピテント ハイ (COMPETENT HIGH)のプロトコールに従った。この様にして得た組換え体から、常法によりミニスクリーニングを行い〔モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning), 1982, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Lab. Press)〕、E1遺伝子内に上記の合成リンカーが組み込まれたプラスミドpUC813を得た。

【0043】次に、このようにして得たDNA1 μ gを制限酵素HincIIで消化した後、制限酵素PvuIIで部分消化し、フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿させた。このようにして得たDNA5 ngをライゲーションキット(宝酒造社製)を用いてライゲーションし、大腸菌DH5を形質転換させた(この時、コンピテントセルは東洋紡績社製のものを用いた)。形質転換させる方法は、東洋紡績社製のコンピテント ハイ (COMPETENT HIGH)のプロトコールに従った。この様にして得た組換え体から常法によりミニスクリーニングを行い〔モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning), 1982, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Lab. Press)〕、ベクター内のPvuIIサイトでなくE1タンパク質遺伝

子内のPvuIIサイトが切断されたプラスミドpUC813dを得た。

【0044】〔5〕E1タンパクの昆虫細胞での発現〔4〕で構築したプラスミドpUC813dにコードされている改変したE1タンパク質を昆虫細胞で発現させるため、松浦らにより作製された、トランスファクターpAc813〔ジャーナル オブ ビロロジー(J. Virol.), 66, 1425-1431, (1992)に記載した改変前のE1タンパク質遺伝子を挿入したトランスファクター、国立予防衛生研究所より入手できる〕の制限酵素NotI及びBamHI切断部位に、pUC813dプラスミドの制限酵素NotI及びBamHI切断断片を常法により挿入し(ライゲーションには、宝酒造社製のライゲーションキットを用い、方法は宝酒造社のライゲーションキット用のプロトコルに従った)、大腸菌DH5を形質転換しミニスクリーニングにより目的のプラスミドを得た。このようにして得たプラスミドを、Maniatisらの方法(「モレキュラー・クローニング」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、86-96(1982))に従い組換え大腸菌から回収、精製しHCV改変E1遺伝子トランスファプラスミドpAc813dDNAを大量に得た。このようにして得たpAc813dDNA12.5μgとウイルス(AcNPV)DNA1μgをトランスフェクション バッファー(20 mM HEPES, 1 mM Na₂HPO₄, 5 mM KCl, 140 mM NaCl, 10 mM グルコース, pH 7.05)750μlと混合し、最終的に蒸留水で950μlとした。このものに2.5 M CaCl₂ 50 μlをチューブを握はんしながら滴下し、室温で30分静置し沈殿を生じさせた。この沈殿をチップで軽くほぐし、Sf9細胞を形質転換した。すなわち、まず直径3.5 cmのシャーレの中でFCS(牛胎児血清)が10%入ったグレース(Grace's)培地(GIBCO社製)中でSf9細胞を1×10⁶/シャーレになるよう培養した。

【0045】次にシャーレから培地を除き、そこに先述のDNAを混合したトランスフェクション バッファーを0.95ml加え室温で1時間静置後、DNA液を除きFCSが10%入ったグレース培地2mlをシャーレに入れて27℃6日間培養した。3日目には幾つかの細胞中に多核体が観察され、6日目にほとんどの細胞が多核体を形成していた。この培養上清を遠心チューブに取り、1,000 rpm、10分間遠心した上清を同時感染ウイルス液とした。

【0046】この同時感染ウイルス液には1mlあたり10⁸個のウイルスが含まれており、またそのうちの約0.5%が組換え体である。組換えウイルスを単離するためにブランク単離法を用いた。その方法は以下の通りである。同時感染ウイルス液を10⁻⁴、10⁻⁵に希釈した。予め6cmシャーレに1枚当り1.5×10⁶個の細胞をまき、吸着させたものを用意し、培地を完全に除いた後、10⁻⁴液、10⁻⁵液を一枚のシャーレあたりそれ

ぞれ100μlずつ加えた。細胞の乾燥を防ぐため、シャーレを15分おきに傾けてウイルス液が全面に行き渡るようにした。このようにして室温で1時間感染させている間に3%シープラークアガロース(Sea Plaque Agarose, 宝酒造社製)を105℃、10分間オートクレープし、46℃で暖めておいた10%FCSを含むグレース培地と1対2の比率で混合し、46℃で保温しておいた。

【0047】感染終了後、ウイルス液を完全に吸い取り、保温された重層寒天培地を細胞がはがれないようにシャーレ1枚あたり2mlずつ静かに加えた。アガロースが固化して乾燥するまでシャーレの蓋を少しずらした状態で静置し、その後1mlの10%FCSを含むグレース培地をさらに重層し、27℃でインキュベーションした。4日間培養した後、ニュートラル レッド(ナカライテスク社製)で細胞を超生体染色した後、位相差顕微鏡で多核体を形成していないブランクを見いだした。この多核体非産生ブランクをパスツールピペットでアガロースごと吸い取り、1mlのグレース培地中でピペッティングして組換えウイルスを浮遊させた。これら一連の操作(感染させてから、4日間培養し該組換えウイルスを単離する操作)をブランク純化法と呼ぶ。該ウイルス浮遊液100μlをとり同様のブランク純化法を行った。これら一連の操作を3回繰り返して野性株の混入のないHCV由来E1タンパク質遺伝子を持つ組換えウイルスAc813dを得た。

【0048】改変E1タンパク質を産出させるために、予め5×10⁶個のSf9細胞を10%FCSを含むグレース培地10mlに懸濁して10cmシャーレに撒き、1時間静置し細胞をシャーレに吸着させた。シャーレから培地を取り除き、Ac813dウイルス液を250μl加え、全体に行き渡らせたのち10%FCSを含むグレース培地10mlを加え27℃で4日間培養した。このようにして、該ウイルスに感染されたSf9細胞外にHCV由来E1糖タンパク質を発現させた。

【0049】〔6〕E1タンパクの動物細胞での発現〔4〕で構築したプラスミドpUC813dにコードされている改変したE1タンパク質を動物細胞で発現させるため、松浦らにより作製された、発現ベクターpSR816X〔ジャーナル オブ ビロロジー(J. Virol.), 66, 1425-1431, (1992)に記載した、改変前のE1タンパク質遺伝子を挿入した動物細胞発現ベクター、国立予防衛生研究所より入手できる〕の制限酵素NotI及びBamHI切断部位に(BamHIは部分消化)、pUC813dプラスミドの制限酵素NotI及びBamHI切断断片を常法により挿入し、大腸菌DH5を形質転換しミニスクリーニングにより目的のプラスミドを得た。このようにして得たプラスミドを、Maniatisらの方法(「モレキュラー・クローニング」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、86-96, (1982))に従い組換え大腸菌から回収、精製しHCV改変E1遺伝子

発現プラスミドpSR813dX DNAを大量に得た。

【0050】〔6〕により作製された発現ベクターpSR813dX DNAを用いてAusubelらの方法〔カレント プロトコールズ イン モレキュラー バイオロジー (Current Protocols in Molecular Biology), グリーン パブリッシング アソシエイツ アンド ウィリー-インターサイエンス (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience), 9・1・1章～9・1・4章, (1987)〕を基にCHO細胞にトランスフェクションしてCHO細胞を形質転換した。

【0051】すなわち、まず直径6cmのシャーレの中でFCS (牛胎児血清) が10%入ったHam F-12培地 (GIBCO社製) 中でCHO細胞をセミコンフルエントな状態になる様培養した。次にシャーレから培地を除き、そこにDNA溶液を滴加するが、DNA溶液は予め次に示す手順に従って調製した。まず直径6cmのシャーレ一枚につき300μlの2xHEBS溶液 (2xHEBS溶液: 1.6%NaCl, 0.074% KCl, 0.05% NaH₂PO₄・12H₂O, 0.2% デキストロース, 1%HEPES, pH 7.05) と10μgの該プラスミドDNAを加え、滅菌水で570μlに合わせた溶液をエッペンドルフ遠心管中に準備する。次に該DNA溶液に30μlの2.5Mの塩化カルシウム溶液を滴加しながらボルテックスミキサーを用い1～2秒間激しく混和する。これを室温で30分間放置するが、その間およそ10分おきにボルテックスミキサーで混和する。この様にしてできたDNA溶液を前述の細胞にかけて室温で30分間静置した。その後FCSが10%入ったHam F-12培地 (GIBCO社製) 5mlをシャーレに加え、37℃、5%CO₂存在下で4～5時間培養した。次にシャーレから培地を除き5mlのTBS++溶液 (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.6 mM NaH₂PO₄, 0.08 mM CaCl₂, 0.08 mM MgCl₂) で細胞を洗浄し、TBS++溶液を除去した後、グリセロールを20%含むTBS++溶液を5ml細胞にかけて室温で1～2分間静置した後、上清を除去した。その後5mlのTBS++溶液で細胞を再び洗浄し、FCSが10%入ったHam F-12培地5mlをシャーレに入れ、37℃、5% CO₂存在下で培養し、48時間が経過した時点で培地を除き、5mlのTBS++溶液で細胞を洗浄した後、細胞にトリプシン-EDTA溶液 (シグマ社) 1mlをかけ、室温で30秒静置した。その後トリプシン-EDTA溶液を除き5分後にFCSが10%入ったHam F-12培地5mlをシャーレに入れて細胞を分散し、細胞数を計測後96ウェルマイクロプレートに0.5細胞/ウェル/100μl、1細胞/ウェル/100μl、2細胞/ウェル/100μl、4細胞/ウェル/100μl、8細胞/ウェル/100μlとなるように細胞をまきG418 (G418硫酸塩 (GENETICIN); GIBCO社製) を600μg/mlの濃度になるように加えて培養を続けた。その後10日が経過した時点で細胞の増殖を確認し、培養上清

50μlを回収し新たに50μlを加えた。

【0052】培養上清中のE1タンパク質は、〔5〕で得た組換えバキュロウイルスAc813d感染Sf9細胞の培養上清を濃縮し、GPCカラムであるAsahipakGS520 (旭化成社製) で分画したE1タンパクをウサギに免疫して得た抗E1抗体を補足 (一次) 抗体とし、C型肝炎患者血清を二次抗体とし、パーオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG抗体 (カベル社製) を三次抗体とするサンドイッチ エライザ法で常法により検出した。

【0053】また、同時に細胞の一部を採取し、ラブレック チャンバー スライド (Lab-Tek Chamber Slides, Nunc4808; 日本インターメッド社製) で一晚培養した。培養したスライドをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) でリンスした後、冷アセトン・メタノール (1:1) 混液に浸し-20℃に15分間置き細胞を固定した。次にこのスライドグラス上に固定した細胞を、PBSで20倍に希釈したC型肝炎患者血清と37℃で30分間反応させた。次にこのスライドグラスを、PBSで3回各5分間洗浄し、PBSで50倍に希釈したFITC標識ウサギ抗ヒトIgG (ダコ・ジャパン社製) と37℃で30分間反応させた。次にこのスライドグラスを、PBSで3回各5分間洗浄し、ろ紙にはさんで乾燥させた後、グリセリンで封入し蛍光顕微鏡で観察した。

【0054】この様にして陽性細胞をスクリーニングしながら、連続3回の限界希釈によりE1タンパク質を持続的に産生する細胞株を樹立した。

【0055】〔7〕昆虫細胞で産生されたE1タンパクのC型肝炎患者血清との反応性の検討

C型肝炎ウイルスに感染したヒトの血清が、〔5〕、〔6〕で発現された該ポリペプチドと免疫学的に反応するので、該ポリペプチドはC型肝炎関連抗原として同定された。この同定は、以下に示す免疫沈殿法により行った。まず、例えば〔5〕で記述した組換えウイルスAc813dをSf9細胞に4PFU/CELLで感染させ、約30時間後に2%透析FCS、正常の1/20濃度のメチオニン、75μCi/mlの³⁵S-メチオニン (アマシャム社製) を含むグレース培地に交換し、約48時間27℃で培養した。

【0056】この培養液を2,000 rpm で5分間遠心分離させ、培養上清を回収した。この標識したE1タンパク質を含む上清100μlに、C型肝炎患者血清1μlを加え4℃で1時間反応させた後、プロテインAアガロース (ファルマシア社製) 10μlを添加し、さらに4℃で1時間反応させた。15,000 rpm、1分の遠心分離によりプロテインAアガロースを沈殿させ、上清を除き200μlのRIPA バッファー (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% ナトリウムデオキシコレート) で3回洗浄し、20μlのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動用試料処理液 (2% SDS、5%メルカプトエタノール、10%グリセリン及

び0.005%プロモフェノールブルーを含む50mMトリス塩酸緩衝液、pH6.8)に溶解した。

【0057】次に、この試料を100℃、10分間煮沸した。このようにして得られた試料10μlを、0.1%SDS-12.5%ポリアクリルアミドゲル(70×85×1mm)に添加した。その際、マーカートンパク質としてファルマシア社製「LMW Kit E」(低分子量マーカートンパク質)を使用した。電極液としてトリス緩衝液(25 mM トリス pH 8.3, 192 mM グリシン, 0.1% SDS)を用い、30 mAの定電流で約45分間泳動後、クーマシー ブリリアント ブルーで常法により染色後乾燥し、オートラジオグラフィーを行った。

【0058】〔8〕E1タンパク質(pUC813由来)と改変E1タンパク質(pUC813d由来)の分泌発現量の比較

〔7〕と同様に組換えバキュロウイルスAc813をSf9細胞に感染させ、アイソトープ標識し、培養上清中のE1タンパク質量を免疫沈殿し、Ac813dのものと比較したところ、図1に示すとおり著しい発現量の差が認められた。

【配列表】

【0059】配列番号:1

配列の長さ:1037

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

アンチセンス:No

起源:Hepatitis C virus

直接の起源

クローン名:pUC010

配列

```

CTGCAGACCG TGCATC ATG AGC ACA AAT CCT AAA CCC CAA AGA AAA ACC AAA   52
Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys
      1              5              10
CGT AAC ACC AAC CGT CGC CCA CAG GAC GTT AAG TTC CCG GGC GGT GGT   100
Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly
      15              20              25
CAG ATC GTC GGT GGA GTT TAC TTG TTG CCG CGC AGG GGC CCC AGG TTG   148
Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu
      30              35              40
GGT GTG CGT GCG ACT AGG AAG ACT TCC GAG CGG TCG CAA CCT CGT GGA   196
Gly Val Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly
      45              50              55              60
AGG CGA CAA CCT ATC CCC AAG GCT CGC CGG CCC GAG GGC AGG ACC TGG   244
Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp
      65              70              75
GCT CAG CCT GGG TAT CCT TGG CCC CTC TAT GGC AAT GAG GGC TTG GGG   292
Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Leu Gly
      80              85              90
TGG GCA GGA TGG CTC CTG TCA CCC CGC GGC TCT CGG CCT AGT TGG GGC   340
Trp Ala Gly Trp Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly
      95              100             105
CCT AAT GAC CCC CGG CGT AGG TCG CGT AAT TTG GGT AAG GTC ATC GAT   388
Pro Asn Asp Pro Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp
      110             115             120
ACC CTT ACA TGC GGC TTC GCC GAC CTC ATG GGG TAC ATC CCG CTT GTC   436
Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val
      125             130             135             140
GGC GCC CCC TTA GGG GGC GCT GCC AGG GCC CTG GCA CAT GGT GTC CGG   484
Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg
      145             150             155
GTT CTG GAG GAC GGC GTG AAC TAT GCA ACA GGG AAT TTG CCC GGT TGC   532
Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys
      160             165             170
TCT TTC TCT ATC TTC CTC TTA GCT CTG CTG TCC TGT TTG ACC ATC CCA   580

```

CTGCAGACCG	TGCATC	ATG	AGC	ACA	AAT	CCA	AAA	CCC	CAA	AGA	AAA	ATC	AAA	52	
		Met	Ser	Thr	Asn	Pro	Lys	Pro	Gln	Arg	Lys	Ile	Lys		
	1					5					10				
CGT	AAC	ACC	AAC	CGC	CGC	CCA	CAG	GAC	GTT	AAG	TTC	CCG	GGC	GGT	100
Arg	Asn	Thr	Asn	Arg	Arg	Pro	Gln	Asp	Val	Lys	Phe	Pro	Gly	Gly	
	15					20					25				
CAG	ATC	GTT	GGT	GGA	GTT	TAC	CTG	TTG	CCG	CGC	AGG	GGC	CCC	AGG	148
Gln	Ile	Val	Gly	Gly	Val	Tyr	Leu	Leu	Pro	Arg	Arg	Gly	Pro	Arg	
	30					35					40				
GGT	GTG	CGC	GCG	ACT	AGG	AAG	ACT	TCC	GAG	CGG	CCG	CAA	CCT	CGT	196
Gly	Val	Arg	Ala	Thr	Arg	Lys	Thr	Ser	Glu	Arg	Pro	Gln	Pro	Arg	
45					50					55				60	

AGG CGA CAA CCT ATC CCC AAG GCT CGC CAA CCC GAG GGT AGG GCC TGG	244
Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala Arg Gln Pro Glu Gly Arg Ala Trp	
65 70 75	
GCT CAG CCC GGG TAC CCT TGG CCC CTC TAT GGC AAT GAG GGC TTG GGG	292
Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Leu Gly	
80 85 90	
TGG GCA GGA TGG CTC CTG TCA CCC CGC GGC TCC CGG CCT AGT TGG GGC	340
Trp Ala Gly Trp Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly	
95 100 105	
CCC ACG GAC CCC CGG CGT AGG TCG CGT AAT TTG GGT AAG GTC ATC GAT	388
Pro Thr Asp Pro Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp	
110 115 120	
ACC CTC ACA TGC GGC TTC GCC GAC CTC ATG GGG TAC ATT CCG CTC GTC	436
Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val	
125 130 135 140	
GGC GCC CCC CTA GGG GGC GCT GCC AGG GCT CTA GCG CAT GGC GTC CGG	484
Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg	
145 150 155	
GTT CTG GAG GAC GGC GTG AAC TAT GCA ACA GGG AAT CTG CCT GGT TGC	532
Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys	
160 165 170	
TCC TTT TCT ATC TTC CTT TTG GCT TTG CTG TCC TGT TTG ACC ATC CCA	580
Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu Thr Ile Pro	
175 180 185	
GCT TCC GCC TAC CAA GTG CGC AAC GCG TCC GGG GTG TAC CAT GTC ACG	628
Ala Ser Ala Tyr Gln Val Arg Asn Ala Ser Gly Val Tyr His Val Thr	
190 195 200	
AAC GAC TGC TCC AAC TCA AGT ATT GTG TAT GAG GCG GCG GAC GTG ATT	676
Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Val Ile	
205 210 215 220	
ATG CAC ACC CCC GGG TGC GTG CCC TGC GTC CGG GAG AAC AAT TCC TCC	724
Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser	
225 230 235	
CGC TGC TGG GTA GCG CTC ACT CCC ACG CTT GCG GCC AGG AAC AGC AGC	772
Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala Arg Asn Ser Ser	
240 245 250	
ATC CCC ACT ACG ACA ATA CGG CGT CAT GTC GAC TTG CTC GTT GGG GCA	820
Ile Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Ala	
255 260 265	
GCT GCT CTC TGT TCC GCT ATG TAT GTG GGG GAT TTT TGC GGA TCT GTT	868
Ala Ala Leu Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Phe Cys Gly Ser Val	
270 275 280	
TTC CTC GTC TCC CAG CTG TTC ACT TTC TCA CCT CGC CGG TAT GAG ACG	916
Phe Leu Val Ser Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg Tyr Glu Thr	
285 290 295 300	
GTG CAA GAC TGC AAT TGC TCA ATC TAT CCC GGC CAT GTA TCA GGC CAT	964
Val Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Val Ser Gly His	
305 310 315	
CGC ATG GCT TGG GAT ATG ATA ATG AAT TGG TCA CCT ACA ACA GCC CTA	1012
Arg Met Ala Trp Asp Met Ile Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu	

320 325 330 1037
 GTG GTA TCG CAG CTA CTC CGG ATC C
 Val Val Ser Gln Leu Leu Arg Ile
 335 340

【0061】配列番号：3

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

CGGGATCCGG AGTAACTGCG

【0062】配列番号：4

配列の長さ：26

配列の型：核酸

配列

CGCTGCAGAC CGTGCATCAT GAGCAC

【0063】配列番号：5

配列の長さ：17

配列の型：核酸

配列

GTAAACGAC GGCCAGT

【0064】配列番号：6

配列の長さ：17

配列の型：核酸

配列

CAGGAAACAG CTATGAC

【0065】

【図面の簡単な説明】

【図1】組換えバキュロウイルスAc813及びAc8

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（PCR用合成DNA）

20

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（PCR用合成DNA）

26

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（シーケンス用合成DNA）

17

鎖の数：一本鎖

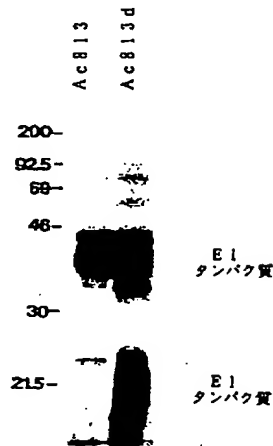
トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（シーケンス用合成DNA）

17

13d感染Sf9細胞の培養上清を、C型肝炎患者血清で免疫沈殿した結果を示す。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 関 誠

神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地三菱
化成株式会社総合研究所内

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-344899 ~ US 5 789 544

(43)Date of publication of application : 27.12.1993

(51)Int.Cl.

C12P 21/02
// C12N 15/51
(C12P 21/02
C12R 1:91)

(21)Application number : 04-152487

(71)Applicant : KOKURITSU YOBOU EISEI KENKYUSHO

(22)Date of filing : 11.06.1992

(72)Inventor : MIYAMURA TATSUO
SAITO IZUMI
MATSUURA ZENJI
HONDA YOSHIKAZU
SEKI MAKOTO

(C) PRODUCTION OF COAT PROTEIN OF HEPATITIS C VIRUS

(57)Abstract:

PURPOSE: To efficiently obtain the subject substance useful as a hepatitis C vaccine, for diagnosis, etc., by transforming a host with an expression vector containing a DNA fragment capable of coding a coat protein of hepatitis C virus, culturing the resultant transformant and then collecting the extracellularly produced substance.

CONSTITUTION: A 50mM tris buffer solution is added to a blood serum of a patient suffering from hepatitis C and the resultant mixture is centrifuged at 20° C for 20min. The obtained supernatant is ultracentrifuged for 5hr and Protenease K(R) and sodium dodecyl sulfate are then added to the formed precipitate to carry out the lysis. The lysate is subsequently extracted with phenol/chloroform to recover nucleic acid, which is then used to synthesize a cDNA. The synthesized cDNA is treated with a restriction enzyme and bound to a vector. The resultant DNA is used to transform Escherichia coli. The transformed Escherichia coli is cloned to sort out a positive clone and its plasmid is recovered, treated with a restriction enzyme and bound to an expression vector. A host is transformed with the resultant expression vector containing a DNA fragment capable of coding a coat protein of the hepatitis C virus and cultured to obtain an extracellularly produced substance. Thereby, the objective coat protein of the hepatitis virus C is provided.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.